

200939043A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

**食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の
評価法に関する研究**

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成22(2010)年3月

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の
評価法に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 能美 健彦

平成22 (2010)年3月

目 次

I. 研究報告

食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の 評価法に関する研究 能美健彦	----- 1
---	---------

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 65
--------------------	----------

III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 69
------------------	----------

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
総括研究報告書

研究課題名:食品添加物等における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

主任研究者: 能美健彦 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされており、食品添加物等に発がん性が認められた場合、その作用機序に遺伝毒性が関与しているかが行政上重要な問題となる。本研究班では、生体防御機能(解毒代謝、DNA 修復、損傷部位の乗り越え DNA 合成等)が遺伝毒性物質の作用を抑制し「実的な閾値」を形成する可能性を検討することを主な目的とする。平成 21 年度は、解毒代謝に関連する *Nrf2* 欠損マウス(青木)、DNA 修復に関連する *Mutyh* 欠損マウス(續)、乗り越え DNA 合成に関わる *Polk* 欠損マウス(能美)の発がん感受性あるいは変異感受性について検討した。また乗り越え DNA 合成活性の異なるバクテリアの変異原に対する感受性を比較した(山田)。DNA 損傷部位や変異部位に結合する蛋白質を網羅的に検出する新手法(SILAC)を開発した(松田)。遺伝毒性発がん物質のリスク評価に関連し、使用禁止となった食品添加物 AF2 について、in vitro(バクテリア、ヒト細胞)と in vivo(マウス)での変異原性を比較し、AF2 の発がんリスクを考察した(本間)。AIDS 治療薬 Viracept に混在した ethyl methanesulfonate (EMS)の遺伝毒性リスクを、閾値がない場合とある場合に分けて検討した(長尾)。これらの研究、調査を通し、遺伝毒性発がん物質の閾値形成機構に関する基盤的研究を推進した。

キーワード: 遺伝毒性発がん物質、閾値、DNA 修復、解毒代謝、損傷部位の乗り越え DNA 合成、食品添加物

分担研究者

青木康展	国立環境研究所、環境リスク研究センター、副センター長
續 輝久	九州大学大学院医学研究院教授
山田雅巳	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
松田知成	京都大学工学研究科 准教授
本間正充	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
長尾美奈子	慶応義塾大学薬学部 客員教授

A. 研究目的

一般に遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされており、突然変異や染色体異常を誘発することにより発がん性を示す物質は、どのように低用量であってもヒトに対して発がんリスクを負わせるものと考えられている。このため、食品添加物等に遺伝毒性と発がん性が認められた場合には、原則的に ADI(一日摂取許容量)は設定されず使用が禁止となる。また環境汚染物質や食品成分のように当該遺伝毒性発がん物質への曝露が不可避な場合には、閾値がないことを前提に、数理モデルを用いて生涯の発がんリスクが推定される。

しかしヒトには、種々の生体防御機能や生体防御物質が存在しており、遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し閾値を形成する可能性が予想される。DNA と反応性を示す発がん物質などの多くは、生体防御物質、抗酸化物質によって不活化される。またグルタチオンやグルクロン酸との抱合を触媒するグルタチオン抱合酵素やグルクロン酸抱合酵素などの解毒酵素により、代謝的に不活化され体外へと排泄される。さらに DNA に損傷が起きたとしても、DNA 修復酵素や、損傷部位を乗り越えて複製を続けるトランスレージョン DNA 合成(以下 TLS と略)、また DNA 損傷を受けた細胞を死に至らしめて個体としての恒常性を保つアポトーシスなどが、遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し、実際的な閾値を形成している可能性が考えられる。

本研究では、解毒代謝能を欠損した *Nrf2* 欠損マウス、DNA 修復能を欠損した *Mutyh* 欠損マウス、TLS 活性を欠損した *Polk* 欠損マウスを用いて、生体防御機能が「実際上の閾値」形成に寄与する可能性を検討することを主な目的とする。また個体レベルの研究を補佐する *in vitro* (ヒト細胞、バクテリア) 研究、機器分析等の手法による DNA 損傷に関する研究を促進し、遺伝毒性物質の閾値形成機構について検討する。さらに内外の研究情報を検索して、遺伝毒性発がん物質のリスク評価および規制に関する知見を整備する。

今年度は、各マウスに関する基礎的情報を得るため、*Nrf2* 欠損マウス(青木)、*Polk* 欠損マウス(能美)の自然突然変異頻度、*Mutyh* 欠損マウスの臭素酸カリウムに対する発がん、変異感受性(續)を検討した。また TLS 活性の異なる Ames 試験菌株の変異原に対する感受性を比較した(山田)。さらに DNA ミスマッチ塩基対に結合する蛋白質を網羅的に検索する新手法(stable isotope labeling of amino acid in cell culture, SILAC)を開発した。遺伝毒性と

発がん性が検出されて使用禁止となった食品添加物 AF2 の変異原性を *in vitro* と *in vivo* で比較し、その発がんリスクについて考察した(本間)。HIV プロテアーゼ阻害剤である *viracept* に混入した遺伝毒性物質 *ethyl methanesulfonate* (EMS) の発がんリスクを、閾値のある場合とない場合に分けて考察した(長尾)。

B. 研究方法

1) *Nrf2* ノックアウト *gpt delta* マウスの作出と肝臓における *gpt* 自然突然変異の解析

東北大院医・山本雅之教授より恵与を受け国立環境研究所で維持している *Nrf2* (+/-) 遺伝型マウス(C57BL バックグラウンド)と *gpt delta* マウスを交配し、*Nrf2* (+/-) *gpt* (+/-) マウスを作出した。これを *Nrf2* (-/-) マウスと交配し、*Nrf2* (-/-) *gpt* (+/-) マウス(以下 *Nrf2* (-/-) マウスと記す)と *Nrf2* (+/-) *gpt* (+/-) マウス(以下 *Nrf2* (+/-) マウスと記す)を用いて、肝臓の *gpt* 変異体頻度(MF)および変異スペクトルの解析を行った。*gpt* 変異体頻度の測定は既報に基づき行った(Aoki et al. *Cancer Res.*, 67, 5643-5648, 2009) (青木)。

2) *Mutyh* 欠損マウスの臭素酸カリウムに対する感受性の検討

C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *Mutyh* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の掛け合わせにより *Mutyh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。また突然変異解析のため大腸菌 *rpsL* トランスジェニックマウスとの掛け合わせにより、レポーターである *rpsL* 遺伝子を持つ *Mutyh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。臭素酸カリウム処理は、0.2% 溶液を、がん解析には16週間、突然変異解析には4週間、自由に飲水させて行った。発がん実験は、マウスを安楽死させた後、腸管を摘出し固定後、腸粘膜を実体顕微鏡下で

観察し、腫瘍の形成を確認した。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った。突然変異の解析は、臭素酸カリウムを投与したマウスの小腸粘膜層からゲノム DNA を採取し、既報(Egashira et al., DNA Repair, 1, 881-893, 2002)に基づき突然変異頻度を算出した。*rpsL* 変異体については PCR 法を用いて増幅し、ダイレクトシーケンス法でそれぞれの突然変異の種類と頻度を決定した(續)。

3) *Polk* ノックイン *gpt delta* マウスの作出と肝臓と精巣における自然突然変異の解析

マウス DNA Pol κ の活性中心のアスパラギン酸とグルタミン酸をそれぞれアラニンに置換したノックインマウスを遺伝子ターゲティング法により作出した(C57BL バックグラウンド)。作出した F1 マウスに変異検出用の *gpt delta* マウスを交配しダブルトランスジェニック動物を得、交配により *gpt (+/+)* の Pol κ ノックイン(以下 Pol κ KI と記す)マウスを作出した。12 週齢の雄 Pol κ KI マウスと Pol κ 野生型の肝臓と精巣における自然突然変異体頻度と変異スペクトルを解析した。*gpt* 及び Spi 変異体頻度(MF)の測定は、既報(Nohmi et al., Mutat. Res., 455, 191-215, 2000)に基づき行った(能美)。

4) TLS 活性の異なるバクテリアを用いる変異原性試験

親株である *Salmonella typhimurium* TA1535 とその改変株 YG3001、YG3206、それら 3 株に pKM101 プラスミドを導入した TA100、YG3008、YG3216 を使用した。pKM101 プラスミドには、TLS に関与する DNA ポリメラーゼ R1 がコードされている。YG3001 と YG3008 は 8-oxo グアニン DNA グリコシラーゼを欠損し、YG3206 と YG3216 はエンドヌクレアーゼ III および VIII を欠損している。バクテリアを用いる復帰変異試験は Maron and Ames の方法(Mutat. Res., 113, 173-215, 1983)に基づいて行った(山田)。

5) SILAC 法によるミスマッチ結合タンパク質の解析

アルギニンとリジンを安定同位体に置換した培地中で A549 細胞を 5 回以上系代培養し、細胞中のタンパク質のすべてのアルギニンとリジンを安定同位体に置き換えた(SILAC ラベル細胞)。等量のラベルした細胞とラベルしていない細胞からそれぞれ核抽出物を調製した。SILAC ラベル細胞の核抽出液はミスマッチ塩基を持つ DNA と反応させ、ラベルしていない細胞の核抽出液はミスマッチを持たない DNA と反応させた。反応後の DNA を混合し、結合蛋白質を SDS-PAGE で分離し、ゲル内トリプシン消化、脱塩の後、ナノHPLC-Q-TOF/MS を用いてプロテオーム解析を行った(松田)。

6) AF2 の Ames 試験とトランスジェニック(Tg)マウス遺伝子突然変異試験

Ames 試験は標準株である TA1535, TA100 (=TA1535/pKM101), TA1538, TA98 (=TA1538/pKM101)と、それぞれに対応するクラシカルニトロ還元酵素欠損株を用いて行った(YG7127, YG7128, YG7131, YG7232)。Tg マウスとしては 8-9 週齢の雄 MutaTMMouse を用い、30mg/kg を一週間おきに 4 回強制経口投与した。溶媒としてはオリーブオイルを用い、一群 4-5 匹のマウスに 10mg/kg で投与した。小核試験はアクリジンオレンジ染色法で小核を有する幼若赤血球を観察し、その出現頻度を測定した。Tg 遺伝子突然変異試験は、最終投与後 7 日目にマウスを屠殺し、肝臓、前胃、大腸、脾臓から DNA を抽出しトランスジーンの *cHMF* を測定した。

7) 遺伝毒性閾値に関する国際動向の分析

文献検索により EMS の低用量域におけるリスク評価をおこなった(長尾)。

(倫理面への配慮)

本研究は、バクテリア、培養細胞、実験動物を用いたものであり、ヒトに関する倫理上の問題は無い。また、全ての実験は、遺伝子組換え実験、動物実験に関する所内の規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) *Nrf2* (-/-)および *Nrf2* (+/-)マウス肝臓で発生した自然発生突然変異のスペクトル解析

Nrf2 (-/-)、*Nrf2* (+/-)および *Nrf2* (+/+)マウス肝臓での自然発生 *gpt* MF を調べた結果、それぞれ 1.47 , 1.24 , 0.72×10^{-5} であり、*Nrf2* 遺伝子がホモばかりでなくヘテロで欠損しても、自然発生突然変異は wild に比べて有意に増加していた。肝臓の自然発生突然変異のスペクトルを解析したところ、*Nrf2* (-/-)マウスでは、*Nrf2* (+/+)マウスで主要な塩基置換であった G:C→A:T transition の発生率が低下し、代わりに G:C→T:A transversion と1塩基欠失の割合が増加していた。しかし、*Nrf2* (+/-)マウスでは自然発生 *gpt* MF が *Nrf2* (-/-)マウスと同程度まで上昇しているにもかかわらず、*Nrf2* (+/+)マウスとほぼ同様の突然変異スペクトルであった(青木)。

2) *Mutyh* 欠損マウスの臭素酸カリウムに対する感受性の検討

マウスに 0.2% 臭素酸カリウム溶液を 16 週間連続飲水投与した結果、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸で多数の上皮性腫瘍の発生を認めた。臭素酸カリウムを投与した野生型マウス雌 9 匹および *Mutyh* 遺伝子欠損マウス雌 8 匹に生じた 1 個体当たりの平均腫瘍数はそれぞれ 1.0 ± 0.7 , 51.0 ± 28.4 であった。0.2% 臭素酸カリウム溶液を 4 週間連続飲水投与した後、突然変異固定のため 2 週間純水を飲水投与し、マウス小腸粘膜層の突然変異を解析した。その結果、臭素酸カリウムを投与し

た野生型マウス雌 4 匹および *Mutyh* 遺伝子欠損マウス雌 5 匹の小腸粘膜での突然変異頻度は平均でそれぞれ $8.94 \pm 3.99 \times 10^{-6}$, $31.55 \pm 10.31 \times 10^{-6}$ であり、対照群と比較して *Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおいて、臭素酸カリウム誘発突然変異頻度の顕著な上昇を認めた。変異体の分子解析により、臭素酸カリウム投与により、G:C→T:A トランスバージョン変異の頻度が野生型マウスでは 2.25 倍、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスでは 8.09 倍上昇していることを明らかにした(續)。

3) *Polk* ノックイン *gpt delta* マウスの肝臓と精巣における自然突然変異の解析

肝臓の *gpt* MF、精巣の *gpt* MF は、共に $\text{Pol } \kappa$ KI マウスと野生型の間には有意な差は認められなかった(肝臓 $\text{Pol } \kappa$ KI 6.6 ± 1.2 , 野生型 8.3 ± 8.9 、精巣 $\text{Pol } \kappa$ KI 2.1 ± 1.2 , 野生型 2.8 ± 1.6)。一方、*Pol* κ の不活化の有無に関わらず、肝臓に対して精巣で変異の頻度が低い傾向が認められた。シーケンス解析により変異のスペクトラムを解析したが、遺伝子型の違いによるスペクトラムの違いは認められなかった。

肝臓の Spi^- MF、精巣の Spi^- MF は、いずれも $\text{Pol } \kappa$ KI で野生型に対し僅かに高い傾向が認められた(肝臓 $\text{Pol } \kappa$ KI 5.3 ± 0.8 , 野生型 4.0 ± 1.2 、精巣 $\text{Pol } \kappa$ KI 5.2 ± 1.6 , 野生型 4.0 ± 0.5)。 *gpt* MF 解析で認められたような、精巣と肝臓間での変異頻度の違いは認められなかった(能美)。

4) TLS 活性の異なるバクテリアを用いる変異原性試験

2-nitrofluorene (2-NF)、glyoxal(Gx)、kethoxal(Kx)、methylglyoxal(MG)の変異原性は、pKM101 プラスミドを持つ株(TA100, YG3008, YG3216)では検出されたが、pKM101 を持たない株(TA1535, YG3001, YG3206)で

は検出されなかった。MGの変異原性は、酸化損傷に対するDNA修復を欠損したYG3008, YG3216では、親株TA100に比べて減弱していた(山田)。

5) SILAC法によるミスマッチ結合タンパク質の解析

コントロールDNAまたはミスマッチDNAに結合したタンパク質は77種類同定された。SILACラベルしたタンパク(Heavy; H)とラベルしていないタンパク(Light; L)のシグナル比(H/L比)が高いものほど、特異的にミスマッチと結合している可能性が高い。高いH/L比を示したタンパク質の中には、ミスマッチ修復タンパク質であるMSH6やMSH2が検出された。そのほかにも機能がよくわからないPCBP1(Poly(rC)-binding protein 1)やNCLといったタンパク質が同定された(松田)。

6) AF2のAmes試験とTgマウス遺伝子突然変異試験

ニトロ還元酵素の有無に係わらず、pKM101を持たない株(TA1535とYG7127)ではAF2の変異原性は検出されなかった。pKM101を持つ株では、ニトロ還元酵素を欠損するYG7128株がTA100株のおよそ半分の復帰変異株数を示した。フレームシフト変異を検出するTA1538株のシリーズでも同様の傾向を得た。Muta™マウスを用いてAF2の*in vivo*変異原性を調べた。しかし、検索したいずれの臓器(肝臓、前胃、大腸、脾臓)においても変異の誘発は認められなかった。また、小核誘発性に関しても陰性の結果を得た(本間)。

7) 遺伝毒性閾値に関する国際動向の分析

GockeらはMuta™マウスにおける*lacZ*変異で閾値の有無を検討している。EMS(0, 1.56, 3.13, 6.25, 25, 50, 100 mg/kg day)を28日間投与し、31日目に骨髄、肝臓、消化管におけ

る突然変異率を調べた。いずれの臓器でも閾値が認められ夫々35.4, 51.3 および24.5 mg/kg dayであった。以上の結果から、マウス遺伝毒性から見たEMSの閾値を24.5 mg/kg dayと推定した。従来からの方法による用量相関が直線であると仮定してEMSのヒトに対する発がんリスクを推定すると、ラットにEMS(3-20 mM)を0.5-3ヶ月飲水投与したで乳がん誘発実験からの外挿では、リスクは0.12%となる。AUC(血中濃度時間曲線下面積)および感受性の増加の補正を行う、と%の桁数で発がんを誘発したことになる。

遺伝毒性物質で閾値のあるEMSとないethyl nitrosourea(ENU)のリスク評価での重要な差異は、EMSは閾値以下の低濃度に分割投与した場合には遺伝毒性は認められないが、ENUの場合は加算されることである。従ってマウスにEMSを28日間投与で得られた閾値は、より長期の投与でも変わらないことが考えられる。Viracept中のEMSは1068ppmで、Viracept摂取期間中のヒトの暴露量は最大で0.055mg/kg day(体重60kg)であった。マウス*in vivo*における遺伝毒性閾値は25 mg/kg/dayである。これらの値から安全係数を計算すると454になる。 C_{max} からの安全係数は370と算出された。AUCから算出した安全係数は27であった(長尾)。

D. 考察

Nrf2は第2相薬物代謝酵素や抗酸化たんぱく質の遺伝子発現に必須な転写因子である。Nrf2が欠損した状態では、薬物代謝酵素や抗酸化系酵素をはじめとしたDNAを防御する機能の活性が低下して、変異原物質への感受性が増加して突然変異頻度が著しく上昇し、その結果「実質的な閾値」が低下あるいは消失する可能性がある。Nrf2-KO *gpt delta*マウスは、薬物代謝酵素や抗酸化酵素が閾値の決定に関与しているかを明らかにするのに適

切な実験動物であると考えられる。G:C→T:A transversion は 8-oxodG が生成されることにより発生するものと考えられる。今回の結果は、*Nrf2* (-/-)マウスの肝臓や肺などの臓器内では、活性酸素種の発生が著しく亢進していることを示している。*Nrf2*-KO *gpt delta* マウスは、抗酸化酵素の閾値決定への関与を検証するのに適切な実験系であることが示唆された(青木)。

0.2%臭素酸カリウムを投与された *MutYh* 遺伝子欠損マウスでは野生型に比べて小腸での発がん頻度が約 50 倍、酸化 DNA 損傷である 8-oxoG に起因すると考えられる G:C→T:A トランスポージョン変異の発生頻度が約 12 倍上昇していた。これらの結果は、*MutYh* 遺伝子欠損マウスと臭素酸カリウム投与を組み合わせた発がん・突然変異誘発の実験系が、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するうえで有用な試験系であることを示している。今回の実験結果でも *MutYh* 遺伝子産物が酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献する可能性を示唆している。しかしながら、今回投与した 0.2%の臭素酸カリウムは野生型マウスでも発がん頻度と突然変異頻度の上昇をもたらしている。今後、臭素酸カリウムを低用量域で投与することにより、発がん・突然変異を検討して行く必要がある(續)。

Pol κ のノックアウト(KO)マウスは既に作出されているが、KO マウスでは発生時より *Pol κ* が欠損しているため、他の Y-family polymerase が代替的に働いている可能性を排除できない。本研究で樹立した *Pol κ* KI *gpt delta* Tg マウスは、不活化した *Pol κ* がタンパクとして存在しているため、より *Pol κ* の機能を詳細に解析することが可能と考えられる。DNA ポリメラーゼの発現には組織特異性が存在することから、*Pol κ* ノックイン *gpt delta* マウスを用い低用量での遺伝毒性試験を行うことで、閾値形成における *Pol κ* の役割について解析が進むことが期待さ

れる(能美)。

今回用いた 4 物質、2-NF、Gx、Kx、MGx については、その変異誘発性は、pKM101 プラスミドに依存していた。pKM101 は損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼである DNA polR1 をコードすることが知られる。TA100 も TA1535 も、かさ高い DNA 付加体を除去する修復系を欠損しているため、これらの化合物による DNA 付加体が残っている条件は同じだが、DNA polR1 の有無により、突然変異の誘発には歴然とした違いが見られる。このことは、化学物質が変異原性を示すに当たり、DNA ポリメラーゼの性質が突然変異の誘発に重要な役割をはたしていることを示している。遺伝毒性物質の実験的な閾値形成における DNA ポリメラーゼの役割をより詳細に検討することが必要である(山田)。

各種 DNA 損傷に特異的な修復タンパク質の同定を行う実験系を確立するため、手始めにミスマッチ DNA を用いて実験系の確認をした。この結果、MSH6 や MSH2 など、ミスマッチ修復特異的なタンパク質を同定することができ、実験系がうまく働いていることが明らかとなった。今後はミスマッチの代わりに様々な DNA 損傷を入れて、特異的に結合するタンパク質を同定し、修復メカニズムの解明を試みる。また DNA 修復が低用量での遺伝毒性物質の作用を抑制する機構について検討する(松田)。

AF-2 は pKM101 が存在する TA100、TA98 では強い変異原性を示したが、親株の TA1535、TA1538 では全く変異原性を示さなかった。この結果は、山田の報告と同様に、AF-2 の変異原性の発現には、DNA ポリメラーゼ RI による誤りがち TLS が必須であることを示している。ニトロ還元酵素に関しては、ニトロ還元酵素の欠損により復帰変異株数が減弱したが、変異原性が無くなることは無かった。この結果から、AF-2 の変異原性は *ntfB* にコードされたクラシカルニトロ還元酵素に依存する経路

と、クラシカルニトロ還元酵素以外の(ニトロ還元酵素に依存する)経路を経て発現することが示唆された。AF2 は、ヒトリンパ芽球培養細胞株 TK6 を用いる遺伝子突然変異試験において、S9mix 非存在下で強い変異原性を示す。従って、AF-2 は S9mix 存在下で、その遺伝毒性作用が減じられるものの、in vitro でバクテリアおよびヒト細胞に強い遺伝毒性を有するものと結論づけられる。今回、我々はトランスジェニックマウスを用いて、肝臓、前胃、大腸、脾臓での突然変異誘発性を解析したが、調べたいいずれの臓器においても変異の誘発は認められなかった。特に、前胃は AF-2 の発がん標的臓器であり、ここでの陰性結果は胃での発がんの原因は遺伝毒性によるものではないことを示唆している。また、小核誘発性に関しても陰性の結果を得た。AF-2 の遺伝毒性は in vitro では明らかであるが、vivo では認められず、遺伝毒性の存在の有無については専門家によるさらなる論議や、追加実験が必要かも知れない(本間)。

Viracept に混入していた EMS は、閾値のない LNT(Linear Non-threshold)モデルでは、マウスとヒトの代謝の違いを考慮するとかなりのリスクを伴うものであると算定される。しかし、遺伝毒性における閾値を考慮した場合は、ヒトにおける EMS の吸収、代謝をより安全側に仮定してのリスク評価で、安全であると算定された。これは事故による事例であるが、遺伝毒性発がん物質の取り扱いが現状のままで良いかを、再検討するには有用な事例であると考え(長尾)。

E. 結論

遺伝毒性の「実地的な閾値」を形成する機構として解毒代謝、DNA 修復、誤りのない TLS が示唆され、それぞれを個体レベルで検討する有用なモデルを作出した。また、in vivo 実験を補佐する in vitro(ヒト細胞、バクテリア)研究、

機器分析等の新手法を開発した。AF2、viracept を事例に、遺伝毒性物質の低用量域におけるリスク評価のあり方について論議した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A.H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, in vivo mutagenesis caused by diesel exhaust in the testis of *gpt* delta transgenic mice, *Genes and Environ.*, 31, 1-8 (2009)
- 2) Y. Aoki., A.H. Hashimoto, K. Amanuma and M. Matsumoto, Potency of air pollutants at DNA adduct formation and assessment by in vivo mutagenesis. In DNA adduct formation, detection and mutagenesis. (ed. Alvarez E. and Cunha R.) Nova Science Publishers. 143-153, 2010.
- 3) K. Komori, T. Takagi, M. Sanada, T-H. Lim, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi and M. Hidaka, A novel protein, MAPO1, that functions in apoptosis triggered by O6-methylguanine mispair in DNA, *Oncogene*, 28, 1142-1150 (2009)
- 4) RS. Galhardo, R. Do, M. Yamada, EC. Friedberg, PJ. Hastings, T. Nohmi and SM. Rosenberg, DinB upregulation is the sole of the SOS response in stress-induced mutagenesis in *Escherichia coli*, *Genetics.*, 182, 55-68 (2009)
- 5) N. Niimi, A. Sassa, A. Katafuchi, P. Gruz, H. Fujimoto, RR. Bonala, F. Johnson, T. Ohta and T. Nohmi, The steric gate amino acid tyrosine 112 is required for efficient

- mismatched-primer extension by human DNA polymerase kappa, *Biochemistry.*, 48, 4239-4246 (2009)
- 6) A. Shibata, D. Maeda, H. Ogino, M. Tsutsumi, T. Nohmi, H. Nakagama, T. Sugimura, H. Teraoka and M. Masutani, Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age, *Mutat. Res.*, 664, 20-27, (2009)
 - 7) DA. Eastmond, A. Hartwig, D. Anderson, WA. Anwar, MC. Cimino, I. Dobrev, GR. Douglas, T. Nohmi, DH. Phillips and C. Vickers, Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme, *Mutagenesis.*, 24, 341-349 (2009)
 - 8) AM. Salem, T. Nakao, M. Takuwa, N. Matoba, T. Tsuboi, H. Terato, K. Yamamoto, M. Yamada, T. Nohmi and H. Ide, Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein cross-links in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 191, 5657-5668 (2009)
 - 9) H. Fukuda, T. Takamura-Enya, Y. Masuda, T. Nohmi, C. Seki, K. Kamiya, T. Sugimura, C. Masutani, F. Hanaoka and H. Nakagama, Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in vitro: REV1 inserts dC opposite the lesion, and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3'-dC terminus, *J. Biol. Chem.*, 284, 25585-25592 (2009)
 - 10) Y. Totsuka, T. Higuchi, T. Imai, A. Nishikawa, T. Nohmi, T. Kato, S. Masuda, N. Kinae, K. Hiyoshi, S. Ogo, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, N. Fukumori, M. Watanabe, T. Sugimura and K. Wakabayashi, Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems, *PartFibre. Toxicol.*, 6, 23-33 (2009)
 - 11) A. Katafuchi, A. Sassa, N. Niimi, P. Gruz, H. Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka, T. Ohta and T. Nohmi, Critical amino acids in human DNA polymerases {eta} and {kappa} involved in erroneous incorporation of oxidized Nucleotides, *Nucleic. Acids. Res.*, 38, 859-867 (2010)
 - 12) N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi, Integration of in vivo genotoxicity and short-term carcinogenicity assays using F344 gpt delta transgenic rats: in vivo mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene structural isomers, *Toxicol. Sci.*, 114, 71-78 (2010).
 - 13) N. Okudaira, Y. Uehara, K. Fujiwara, N. Kagawa, A. Ootsuyama, T. Norimura, K. Saeki, T. Nohmi, K. Masumura, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka and T. Ono, Radiation dose-rate effect on mutation induction in spleen and liver of *gpt delta* mice, *Radiat. Res.*, 173, 138-147 (2010)
 - 14) M. Yamada, K. Matui, A. Katafuchi, M. Takamune and T. Nohmi, Development of tester strains deficient in Nth/Nei DNA glycosylases to selectively detect the mutagenicity of oxidized DNA pyrimidines, *Genes and Environ.*, 31, 69-79 (2009)
 - 15) T. Oyama, H. Nagayoshi, T. Matsuda, M.

- Oka, T. Isse, H.S. Yu, P.T.T. Phuong, M. Tanaka, N. Kagawa, K. Kaneko and T. Kawamoto, T., N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in organs of Aldh2 knockout mice treated with acetaldehyde inhalation. *Frontiers in Bioscience*, In press
- 16) K. Kawai, P.H. Chou, T. Matsuda, M. Inoue, K. Aaltonen, K. Savela, Y. Takahashi, H. Nakamura, T. Kimura, T. Watanabe, R. Sawa, K. Dobashi, Y.S. Li, and H. Kasai, DNA Modifications by the omega-3 Lipid Peroxidation-Derived Mutagen 4-Oxo-2-hexenal in Vitro and Their Analysis in Mouse and Human DNA. *Chem Res Toxicol*. In press
- 17) 松田, 永吉, 梶村, 周, 液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いた DNA 損傷研究法. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 57, 301-304 (2009)
- 18) 松田, 足立, 周, アダクトミクス-DNA およびタンパク質付加体の網羅的解析. *実験医学増刊*, 27, 2481-2488 (2009)
- 19) Y. Takashima, M. Sakuraba, T. Koizumi, H. Sakamoto, M. Hayashi and M. Honma, Dependence of DNA double strand break repair pathways on cell cycle phase in human lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen.*, 50, 815-822 (2009)
- 20) J. Wang, J.R. Sawyer, L. Chen, T. Chen, M. Honma, N. Mei and M.M. Moore, The mouse lymphoma assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. *Toxicol Sci.* 109, 96-105 (2009)
- 21) F. Yatagai, K. Sugawara, S. Enomoto, and M. Honma, An approach to estimation from DSB Repair Efficiency. *J. Radiat. Res.*, 50, 407-413 (2009)
- 22) N. Koyama, M. Yasui, Y. Oda, S. Suzuki, T. Satoh, T. Suzuki, T. Matsuda, S. Masuda, N. Kinase and M. Honma, Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environ Mol Mutagen.* in press.
- 23) K. Inami, M. Nagao, S. Ishikawa and M. Mochizuki. Mutagenicity of heterocyclic amines by chemical models for cytochrome P450 in the Ames assay. *Gene Environ.* 2010: 32: in press.
2. 学会発表
- 1) Aoki Y. Enhanced in vivo mutations in the lung of phase II enzyme-suppressed mice. X International Conference on Environmental Mutagens. Firenze, Italy, August 2009.
- 2) Aoki Y. Assessment of in vivo mutagenesis induced by environmental chemicals using transgenic animals for detecting mutagens. 2nd International Conference on Environmental Health Science. Seoul, Korea, October 2009.
- 3) Aoki Y., Hashimoto A.H., Amanuma K., Matsumoto M., Masumura K., Nohmi T. In vivo mutagenesis induced by the air pollutants in the testis of *gpt* delta transgenic mice. 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, HORIBA International Conference, CDBIM Symposium, 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, Tokyo, Japan, October 2009
- 4) Aoki Y., Matsumoto M., Relationship between carcinogenic potency and in vivo mutagenicity of tested chemicals, The 38th

- Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS), Shizuoka, November 2009
- 5) 青木康展 (2009) 有害大気汚染物質に関わる大気環境基準(指針値)設定におけるリスク評価. 日本リスク研究学会第 22 回年次大会, 東京 November 2009.
 - 6) Aoki Y., Hashimoto A.H., Matsumoto M., Sugawara Y., Goto S., Masumura K., Nohmi T. Benzo[a]pyrene-Induced Mutagenesis in the Lungs of Young and Old Mice: Young Mice Are Highly Susceptible. CCT Meetings PPTOX II : Role of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease, Miami Beach, USA, December 2009
 - 7) Lim T-H., Hidaka M., Nakatsu Y., Sekiguchi M., Tsuzuki T., Characterization of Mapo1-defective mutant that is unable to induce apoptosis triggered by alkylated DNA damage 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.09.
 - 8) Hidaka M., Komori K., Takagi Y., Sanada M., Lim T-H., Nakatsu Y., Tsuzuki T., Sekiguchi M., MAPO1 plays a role in the induction of apoptosis to preserve genome integrity from environmental stress, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.10.
 - 9) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 岡素雅子, 續輝久, 中別府雄作, 酸化的 DNA 損傷に起因する染色体変異とその抑制機構, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009.12.10.
 - 10) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 酸化的 DNA 損傷と生殖細胞ゲノム変異, 日本環境変異学会第 38 回大会, 2009.11.26.
 - 11) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 酸化的 DNA 損傷と生殖細胞ゲノム変異, 日本放射線影響学会第 52 大会, 2009.11.11.
 - 12) Tsuzuki T., Piao J., Isoda T., Sakumi K., Nakabeppu Y., Nakatsu Y., Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "Cancer and DNA Repair", 2009.11.10.
 - 13) 續輝久, 磯田拓郎, 朴晶淑, 作見邦彦, 中別府雄作, 中津可道, 酸化ストレス誘発発がんの抑制に関する分子機構の解明-*Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として-, 日本生化学会第 82 回大会, 2009.10.24.
 - 14) 續輝久, 酸化ストレス誘発発がんの抑制に関する分子機構の解明-*Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として-, 第 51 回日本消化器病学会大会, 2009.10.15.
 - 15) 松本戴恭, 朴晶淑, 中津可道, 前原喜彦, 續輝久, *Trp53* 欠損マウスを用いた KBrO_3 投与による酸化ストレス誘発小腸腫瘍の解析, 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009.10.01.
 - 16) 中津可道, 松本戴恭, 朴晶淑, 續輝久, 酸化ストレス誘発消化管発癌抑制における癌関連遺伝子の働き, 日本遺伝学会第 81 回大会, 2009.09.16.
 - 17) 日高真純, 高木康光, 真田正幸, Lim Teik-How, 中津可道, 續輝久, 関口睦夫, アルキル化損傷誘導アポトーシス経路で機能する MAPO1 タンパク質複合体, 日本遺伝学会第 81 回大会, 2009.09.16.
 - 18) 大野みずき, 作見邦彦, 古市正人, 續輝久, 中別府雄作, 酸化損傷塩基の修復能を欠損するマウスにおける継世代的影響

- の解析,日本遺伝学会第81回大会,
2009.09.16.
- 19) Tsuzuki T., Piao J., Isoda T., Sakumi K., Nakabeppu Y., Nakatsu Y., Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM),2009.08.23.
- 20) Tsuzuki T., Piao J., Isoda T., Sakumi K., Nakabeppu Y., Nakatsu Y., Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice,3rd ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis,2009.06.01.
- 21) Hidaka M., Komori K., Takagi Y., Sanada M., Lim T-H, Nakatsu Y, Tsuzuki T., Sekiguchi M.,A new member of genes, Mapo1, involve in O6-methylguanine-induced apoptosis,3rd ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis,2009.06.01.
- 22) Piao J, Isoda T., Nakatsu Y., Sakumi K., Nakabeppu Y., Tsuzuki T., Susceptibility of various types of DNA repair-deficient mice to intestinal tumorigenesis induced by potassium bromate,2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2009),2009.05.18.
- 23) Nohmi, T., Possible mechanisms underlying practical threshold for genotoxic carcinogens, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 24) Totsuka, Y., Nohmi, T., S. Kato, Masuda, S., Kinae, N., Kawanishi, M., Yagi, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. Genotoxicity of nanoparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 25) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Inoue, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, In vivo mutagenicity of structural isomers 2,4-DAT and 2,6-DAT in the target organ for carcinogenicity in F344 *gpt* delta transgenic rat, The 10th International Conference on Environmental Mutagens (10th ICEM), Firenze, Italy (2009. 8)
- 26) Y. Totsuka, T. Imai, A. Nishikawa, T. Nohmi, M. Kawanishi, T. Yagi, T. Ichinose, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Genotoxicity of nanoparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 27) Y. Suzuki, T. Okamura, D. Hibi, Y. Ishii, M. Jin, T. Umemura, T. Nohmi, A. Nishikawa, Combined effects of food-derived CYP1A2 inducers on *in vivo* mutagenicity of IQ, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 28) T. Inoue, M. Tasaki, Y. Ishii, T. Okamura, Y. Suzuki, M. Jin, D. Hibi, T. Nohmi, T. Umemura, A. Nishikawa, Lack of *in vivo* mutagenicity and tumor-promotion activity in the livers of rats treated with tocotrienol, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 29) M. Yamada and T. Nohmi, Screening of endogenous mutagens using YG3206,

- modified Ames tester strain, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 30) N. Toyoda, T. Inoue, K. Masumura, T. Umemura, A. Nishikawa, T. Nohmi, The aromatic amine 2,4-DAT induced point mutations in the target organ of carcinogenicity in F344 *gpt* delta rat, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 31) T. Umemura, Y. Ishii, T. Inoue, M. Jin, Y. Suzuki, D. Hibi, Y. Kodama, T. Nohmi, A. Nishikawa, Facilitative effects of simultaneous administration of flumequine on *in vivo* mutagenicity of MeIQx, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009. 10)
- 32) R. Ohta, H. Sui, T. Shiragiku, A. Akahori, M. Nakajima, H. Hayashi, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 1) Distinguishable of hepatic carcinogens from a non-carcinogen, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 33) O. Tajima, S. Yamada, Y. Kawamura, H. Hayashi, T. Takayanagi, H. Hori, W. Fujii, K. Masumura, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 2) Evaluation of genotoxicity of aristolochic acid, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 34) T. Noguchi, T. Kamigaito, K. Narumi, R. Takashima, S. Hamada, H. Sanada, K. Masumura, M. Hasuko, T. Nohmi, Collaborative study of the *gpt* delta transgenic rat mutation assays: 3) Evaluation of genotoxicity of Nickel subsulfide by intratracheal instillation, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 35) H. Sui, K. Kawakami, N. Sakurai, H. Okutomi, R. Ohta and T. Nohmi, Further improvement of high-throughput fluctuation Ames test (Part V), The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 36) Y. Matsumoto, Y. Totsuka, S. Masuda, T. Kato, T. Nohmi, S. Goto, T. Sugimura, K. Wakabayashi, *In vivo* genotoxicity induced by nanoparticles, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 37) H. Ide, A. Salem, T. Nakano, M. Takuwa, H. Terato, K. Yamamoto, M. Yamada and T. Nohmi, Genetic analysis of repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein crosslinks, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 38) P. Gruz, M. Takamune, M. Yamada and T. Nohmi, Detection of UV-mutagenesis in umuDC-deficient strain of Escherichia coli expressing human DNA polymerase η , The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 39) K. Masumura, T. Nohmi, Inserted position of lambda EG10 transgene on *gpt* delta transgenic mouse genome, The 38th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (38th JEMS)(2009. 11)
- 40) AM. Salem, T. Nakano, M. Takuwa, H

- Terato, K. Yamamoto, M. Yamada, T. Nohmi and H. Ide, Repair and damage tolerance mechanisms for DNA-protein crosslinks in *Escherichia coli*, The 52nd Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society (2009. 11)
- 41) A. Katafuchi, A. Sassa, P. Gruz H. Fujimoto, C. Masutani, F. Hanaoka and T. Nohmi, The activity of 8-oxo-dGTP incorporation of human DNA polymerase η and κ , The 52nd Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society (2009. 11)
- 42) N. Niimi, S. Iizumi, N. Adachi, H. Koyama and T. Nohmi, Roles of DNA polymerase kappa in UV- and chemically-induced mutagenesis in human cells, The 32nd Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan. (2009. 12)
- 43) T. Nohmi, Development and validation of in vivo genotoxicity assay using transgenic animals, Special lecture I, The 26th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2010. 2)
- 44) N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Muramatsu, K. Masumura, T. Tanaka and T. Nohmi, Chemopreventive effects of capsaicin and silymarin in F344 gpt delta transgenic rat, The 26th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology (2010. 2)
- 45) ピーターグルーズ、山田雅巳、高宗万希子、能美健彦、ヒト DNA ポリメラーゼ η をコードする大腸菌 *umuDC* 欠損株における紫外線による誘発突然変異の検出、日本環境変異原学会第 38 回大会 (2009.11)
- 46) Muto, S., Kato, K., Yamamura, E., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsuda, T., Sugiyama, A., and Uno, Y. (2009) Significance of DNA adductome analysis in in vitro micronucleus test, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 120, Firenze, Italy.
- 47) Matsuda, T., Nagayoshi, H., Oka, M., Yukawa, Y., Hori, K., Kawamoto, T., Muto, M., and Oyama, T. (2009) ALDH2 genotype is critical for DNA adducts formation in mice treated with alcohol and acetaldehyde, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 200, Firenze, Italy.
- 48) Matsuda, S., Matsui, S., and Matsuda, T. (2009) Approach to toxicity evaluation of C60 fullerene using several in vitro methods, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 213, Firenze, Italy.
- 49) Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Matsumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinae, N., Matsuda, T., Nohmi, T., and Honma, M. (2009) Child-adult differences in evaluation of in vivo genotoxicity of acrylamide, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 212, Firenze, Italy.
- 50) Kawanishi, M., Nishida, H., Ishii, H., Kanno, T., Takamura, T., Matsuda, T., and Yagi, T. (2009) Formation, DNA repair, and TLS of 3-nitrobenzanthrone-derived DNA adducts, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 179, Firenze, Italy.
- 51) Ihara, M., Yasui, M., Matsui, S., Shibutani,

- S., and Matsuda, T. (2009) Frequent incorporation of formaldehyde derived N2-methyl-2'-deoxyguanosine triphosphate into DNA during DNA synthesis catalyzed by bacterial and mammalian DNA polymerase, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 213, Firenze, Italy.
- 52) Chou, P.-H., Kageyama, S., Matsuda, S., Kanemoto, K., Sasada, Y., Oka, M., Shinmura, K., Mori, H., Kawai, K., Kasai, H., Sugimura, H., and Matsuda, T. (2009) Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2-nonenal and 4-oxo-2-hexenal in human autopsy tissues, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 157, Firenze, Italy.
- 53) Adachi, J., Kihara, K., and Matsuda, T. (2009) Oxidative modificomics analysis of cysteine thiols, In 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) p 199, Firenze, Italy.
- 54) 萩尾ら(2009) 大気汚染物質 3-ニトロベンズアントロンによるDNA付加体の生成および修復の効率, In 日本環境変異原学会第38回大会, 静岡.
- 55) 松田(2009) LC/MS/MSを用いたDNA付加体の網羅的解析に関する研究, In 日本環境変異原学会第38回大会, 静岡.
- 56) 小山ら (2009) ライフステージ(週齢)を考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価, In 日本環境変異原学会第38回大会, 静岡.
- 57) Honma, M., Kumita, W., and Sakuraba, M.: Demonstration of ionizing irradiation inducing genomic instability via breakage-reunion-bridge cycle in human cells by CGH-microarray. Keystone symposia "Genome Instability and DNA Repair (2009.3)
- 58) Honma, M., Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Imai, T., Yamamoto, Y., Kumita, W., Masumura, K., Masuda, S., Kinase, N., Matsuda, T., and Nohmi, T.: Child-adult differences in evaluation of in vivo genotoxicity of acrylamide. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)
- 59) Kimura, A., Sakamoto, H., Saigo, K., Sukamoto, T., and Honma, M.: Establishment of simple in vitro Comet Assay Protocol. 48th Annual Meeting for Society of Toxicology (2009.3)
- 60) Honma, M.: DNA double strand break repair and genomic stability. The 14th Academic Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2009. 7)
- 61) Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity, The 5th National Congress of Chinese Society of Toxicology (2009.8)
- 62) Uno, Y., Kojima, H., Honma, M., Tice, R., Corvi, R., Schechtman, and Hayashi, M.: In vivo Comet assay: update on going international validation coordinated by JaCVAM.
- 63) Yasui, M., Koyama, N., Koizumi, T., Sakuraba, M., Takashima, Y., Hayashi, M., Sugimoto, K., and Honma, M.: Life cycle of micronucleus analyzed by confocal live cell imaging. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- 64) Koyama, N., Kimura, A., Yasui, M., Takami, S., Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Imai, T., Shibutani, M., Suzuki, T., Yamamoto, A., Kumita, W., Masumura, K., Horibata, K., Masuda, S., Kinase, N., Nohmi,

- T., and Honma, M.: Child-adult difference in evaluation of in vitro genotoxicity of acrylamide. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- 65) Suzuki, T., Kohara, A., Ramadan, A., Kikuchi, Y., Honma, M., and Hayashi, M.: Comparative study of in vitro genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for Balkan endemic nephropathy. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- 66) Honma, M., Yamakage, K., Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., Hayashi, M., Nakajima, M., Suzuki, M., Corvi, R., Uno, Y., Schechtman, L., Tice, R., and Kojima, H.: International validation study of the in vitro alkaline Comet assay. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- 67) Hirose, A., Kamata, T., Yamazaki, T., Sato, K., Yamada, M., Ono, A., Fukumoto, T., Okamura, H., Mirokuji, Y., and Honma, M.: Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavour chemicals. 10th International Conference on Environmental Mutagens (2009.8)
- 68) Honma, M.: The new ICH guidance on genotoxicity International Conference on Environment, Occupational & Lifestyle Concern- Transdisciplinary Approach (2009.9)
- 69) 鈴木孝昌、小原有弘、小木美恵子、田邊思帆里、本間正充; 8 番染色体特異的 CGH アレイ解析による各種がん細胞株での c-myc 遺伝子増幅形式の解析, 第 68 回日本癌学会学術総会(200.10)
- 70) Honma M, Takashima Y, Sakuraba M, Koizumi T, Sakamoto H, and Hayashi M: DNA double strand break repair pathways and its dependence on cell cycle phases in human lymphoblastoid cells. Environmental Mutagen society 40th Annual Meeting (2009.10)
- 71) 本間正充; In vitro 遺伝毒性試験における最高用量と細胞毒性の評価, 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 72) 真田尚和、櫻田直美、米澤豊、入山昌美、本間正充; コルヒチン及び、ビンブラスチンのラット末梢血を用いた小核試験, 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 73) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、井上薫、吉田緑、今井俊夫、渋谷淳、鈴木拓也、増村健一、堀端克良、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充; ライフステージ(週齢)を考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価, 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 74) 安井学、小山直己、高島良生、林真、杉本憲治、本間正充; 共焦点ライブセルイメージングによって明らかとなった小核のライフサイクル, 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 75) 鈴木孝昌、小原有弘、ラマダンアリ、菊池裕、本間正充、林真; バルカン腎症の原因物質としてのアリストロキア酸およびオクラトキシン A, 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 76) 谷田貝文夫、高橋昭久、本間正充、鈴木ひろみ、大森克徳、関真也、橋爪藤子、鶴飼明子、島津徹、榎本秀一、堂前直、大西武雄、石岡憲昭; 国際宇宙ステーション利用実験: ヒト培養細胞の突然変異解析から宇宙環境の生物影響を解明する試み, 日本環境変異原学会第 38 回大会(2009.11)
- 77) 山本歩、本間正充; Unconectable I-SceI サイトの挿入による放射線損傷様二本鎖 DNA 切断の修復機構の解析, 日本放射線影響

学会第 52 回大会(2009.11)

- 78) 安井学、本間正充;8-オキソグアニン 1 分子のゲノム内における突然変異誘発能の解析系の確立;低線量電離放射線の暴露モデルとして、日本放射線影響学会第 52 回大会(2009.11)
- 79) 本間正充、山影康次、Burlingson, B., Escobar, P., Pant, K., Kraynak, A., 林真、中嶋まどか、鈴木雅也、Corvi, R., 宇野芳文、Schechtman, L., Tice, R., 小島肇;In vitro アルカリコメットアッセイ国際バリデーション研究, 第 22 回日本動物実験代替法学会総会(2009.11)
- 80) Honma, M., The new paradigm of genotoxicity testing in regulatory science -ICH guideline and IWGT consensus- The 1st International Symposium on the Drug Safety Evaluation (2009.12)

H. 知的所有権の取得状況

なし

研究課題名：食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究課題名：DNA 防御機能抑制条件下での体内突然変異の解析

分担研究者： 青木康展 独立行政法人国立環境研究所
環境リスク研究センター 副センター長

研究要旨

第2相薬物代謝酵素や抗酸化たんぱく質の発現が抑制された状態では、DNA付加体の生成が促進されて、突然変異発生頻度が上昇し、「実質的閾値」が低下する可能性がある。これを検証する実験系として、第2相薬物代謝酵素等の遺伝子発現に必須な転写因子である Nrf2 が欠損した *gpt delta* マウス (Nrf2(-/-) *gpt*(+/+)) の作出を進めた。

Nrf2(-/-) マウスにおける突然変異の性質を調べるために、Nrf2(-/-)-、Nrf2(+/-)-、Nrf2(+/+)-*gpt delta* マウスの肝臓で発生した自然発生突然変異のスペクトルを解析した。その結果 Nrf2(-/-) では、Nrf2(+/+) に比べて G:C → T:A transversion と 1塩基欠失の発生率が増加していた。活性酸素種により生成される付加体である 8-oxodG が Nrf2(-/-) での自然突然変異頻度の上昇に関与していることが示唆された。

キーワード： 遺伝毒性発がん物質、活性酸素種、*gpt delta* トランスジェニッククラット

A. 研究目的

薬物代謝酵素やDNA修復系などDNA防御機能が抑制された動物の臓器では、変異原物質への感受性が増加して、突然変異頻度が著しく上昇し、「実質的な閾値」が低下あるいは消失する可能性がある。

第2相薬物代謝酵素や抗酸化たんぱく質の遺伝子発現に必須な転写因子である Nrf2 を、遺伝子導入技術により欠損させた Nrf2-KO マウスでは、薬物代謝酵素誘導をはじめとしたDNA付加体の生成を抑制す

る機能が低下している。一方、変異検出用のレポーター遺伝子を導入したトランスジェニック動物は、標的臓器で発生した突然変異を検出する最もよい方法である。この方法では、化学物質に曝露した動物の臓器から入フェージ DNA 上に載せたレポーター遺伝子を、in vitro パッケージング法により入フェージ粒子として回収して大腸菌に感染させ、動物個体で起きた変異を、大腸菌を用いて検出する。また、検出された変異体を DNA シークエンス解析することで、